


**METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION AND PROMOTING  
PROLIFERATION OF REGULATORY T-CELL****Publication number:** JP2003102471**Publication date:** 2003-04-08**Inventor:** MASUYAMA JUNICHI**Applicant:** KIRIN BREWERY**Classification:**

**- international:** C12N5/06; A61K39/395; A61K45/00; A61P29/00;  
A61P37/06; C07K16/28; C12N5/06; A61K39/395;  
A61K45/00; A61P29/00; A61P37/00; C07K16/18;  
(IPC1-7): C12N5/06; A61K39/395; A61K45/00;  
A61P29/00; A61P37/06

**- european:** C07K16/28; C07K16/28A12

**Application number:** JP20010305588 20011001**Priority number(s):** JP20010305588 20011001**Also published as:** US2003064067 (A)**Report a data error he****Abstract of JP2003102471**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for inducing differentiation and promoting proliferation of a regulatory T-cell. **SOLUTION:** This method for inducing the differentiation and promoting the proliferation of the regulatory T-cell comprises making a CD3 agonist and a 4C8 antigen agonist act on a immunocyte expressing CD3 and 4C8 antigen.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-102471

(P2003-102471A)

(43) 公開日 平成15年4月8日 (2003.4.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/06	Z N A	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395			N 4 C 0 8 4
		45/00	4 C 0 8 5
45/00		A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	1 0 1	37/06	
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-305588(P2001-305588)

(22) 出願日 平成13年10月1日 (2001.10.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年4月17日 日本リウマチ学会発行の「リウマチ 2001 V o 1 4 1, N o. 2」に発表

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 益山 純一

栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自

治医科大学 アレルギー・膠原病学講座内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC12 BB34 BB40

CA44

4C084 AA17 NA14 ZB082 ZB152

4C085 AA13 AA14 BB11 BB17 EE01

(54) 【発明の名称】 調節性T細胞の分化誘導・増殖促進方法

(57) 【要約】

【課題】 調節性T細胞の分化誘導・増殖促進方法の提供。

【解決手段】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞に、CD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストを作用させることを特徴とする、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞に、CD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストを作用させることを特徴とする、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進する方法。

【請求項2】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血、リンパ節又は胸腺に含まれるものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、T細胞である請求項1記載の方法。

【請求項4】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血単核球である請求項1記載の方法。

【請求項5】 CD3アゴニストが、抗CD3抗体である請求項1記載の方法。

【請求項6】 4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である請求項1記載の方法。

【請求項7】 抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である請求項6記載の方法。

【請求項8】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が、生体内で行われるものである請求項1記載の方法。

【請求項9】 CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が、生体外で行われるものである請求項1記載の方法。

【請求項10】 分化誘導された調節性T細胞が、CD25及びCD152を発現し、かつIL-10を産生するものである請求項1記載の方法。

【請求項11】 分化誘導された調節性T細胞が、他のT細胞のサイトカイン産生、増殖及び／又は活性化を抑制するものである請求項1記載の方法。

【請求項12】 4C8抗原アゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進するための医薬組成物。

【請求項13】 4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である請求項12記載の医薬組成物。

【請求項14】 抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である請求項13記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、調節性T細胞の分化誘導・増殖促進方法、及び該方法に使用するための医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】1. 調節性T細胞

種々の病原体に対する生体防御のシステムとしての免疫系の中心的役割を担う細胞群の一つにT細胞がある。T細胞は大別してCD4陽性のヘルパーT細胞とCD8陽性の細胞傷害性T細胞に分けられるが、前者は特に抗原刺激後の特定の分化成熟段階でのサイトカイン産生パターンによって、主にIFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞、IL-4を産

生するTh2細胞などに分類可能である。一般的に前者は細胞性免疫、後者は液性免疫として生体防御に深く関与している。免疫応答はこのような性質の異なるT細胞の働きによって巧妙なバランスのもとに病原体の排除や感染抵抗性の獲得に深く関与している。通常健全な免疫応答においては外来の非自己抗原に対してはそれらを排除する機構が働き、生体を形成する自己抗原に対しては免疫学的寛容が成立しており排除機構が働かないことが知られている。しかしながら自己抗原に対する過剰な免疫応答が働く事によって所謂自己免疫疾患が生ずる。このように自己抗原に対する免疫学的寛容は絶対的なものではないが、T細胞レベルにおいても種々の免疫学的寛容が誘導される仕組みが分かっている。一つは、中枢寛容(central tolerance)と呼ばれる胸腺における自己反応性T細胞クローンの排除の機構(Kisielow, P. et al., 1988. Nature. 333:742-746.)、他方は末梢寛容(peripheral tolerance)と呼ばれる機構による自己反応性T細胞の胸腺外での制御である。後者には、細胞死の誘導あるいは自己抗原に対する不応答性(anergy)の誘導(Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Science. 251:1225-1228.; Jenkins, M.K., and R. H. Schwartz. 1987. J. Exp. Med. 165:302-319.)と共に、調節性T細胞(regulatory T cell)による能動的な抑制(Shevach, E.M. 2000. Annu. Rev. Immunol. 18:423-449.)の機構が知られている。調節性T細胞とは、近年提唱されたT細胞の新たな概念であり、他のT細胞に対して抑制的な作用を有するということによって定義付けられる。免疫応答は巧妙なバランスのもとに成り立っており、例えば上述のTh1細胞及びTh2細胞はお互いに夫々の免疫応答に拮抗的に働き、一方が他方に対する調節性T細胞として作用することが知られるようになって来た。反面、調節性T細胞としての細胞集団の存在の検証とその性状解析については免疫学の近年の歴史においても多くの議論があるところである。このような調節性T細胞はin vitro又はin vivoにおいて特定の免疫応答を抑制又は調節する機能を有する細胞として研究され、細胞表面マーカー、産生するサイトカインの種類や抑制・調節の機構などによって種々の細胞集団として報告されてきている(Roncarolo, M.G., and M.K. Levings. 2000. Curr. Opin. Immunol. 12:676-683.)。

【0003】これらの調節性T細胞の中でも最もよく研究されている細胞集団は、以下に述べるCD4陽性CD25陽性であることをマーカーとするT細胞集団であり、おもにマウス・ラットなどのヒト以外の生物種で研究されてきた。これらのT細胞集団は、特定の細胞表面分子の発現を指標にそれらを除いたT細胞を例えばT細胞及びB細胞不全のSCIDマウス又はラットに移入することで臓器特異的自己免疫疾患(甲状腺炎、インシュリン依存性自己免疫糖尿病、大腸炎など)が誘導されることを指標に性状解析が進んできた(Sakaguchi, S., et al., 1985.

J. Exp. Med. 161:72; Itoh, M., et al., 1999. J. Immunol. 162:5317-5326.)。即ち、正常マウス又はラットのCD4陽性脾臓細胞からCD25陽性、RT6.1陽性(ラットの成熟T細胞の大部分に発現)、CD5強陽性、又はCD45RB弱陽性(マウス)若しくはCD45RC弱陽性(ラット)の細胞を除去して、残りのT細胞をT細胞及びB細胞不全のSCIDマウス又はラットに移入する事で臓器特異的自己免疫疾患が誘導された。これまでこのような調節性T細胞特異的なマーカーは見出されておらず、上記のマーカーは調節性T細胞の機能とは直接関連付けられない、細胞が活性化されている状態、抗原刺激を受けた状態、免疫学的記憶状態にあることを表すマーカーにしか過ぎない。しかしながら、免疫不全動物に臓器特異的自己免疫疾患を誘導する機能のみならず、逆に特定の細胞集団を移入することで自己免疫疾患及び自己免疫性炎症を抑制する機能を有する事を指標として調節性T細胞集団の解析が進み(Itoh, M., et al., 1999. J. Immunol. 162:5317-5326; Sakauchi, S. et al., 1995. J. Immunol. 155:1151-1164; Asano, M. et al., 1996. J. Exp. Med. 184:387-396; Read, S. et al., 2000. J. Exp. Med. 192:295-302; Salomon, B. et al., 2000. Immunity. 12:431-440; Stephens, L. A., and D. Mason. 2000. J. Immunol. 165:3105-3110.)、CD4、CD25共に陽性であるT細胞集団が慣習的に調節性T細胞のマーカーとなり得ることが知られるに至った。

【0004】上記のようにマウス及びラットにおいて、CD4陽性CD25陽性の調節性T細胞が同定された一方で、ヒトにおける同様の細胞の存在はようやく2001年になって複数のグループから報告されたに過ぎない(Jonuleit, H. et al., 2001. J. Exp. Med. 193:1285-1294; Levinger, M. K. et al., 2001. J. Exp. Med. 193:1295-1301; Dieckmann, D. et al., 2001. J. Exp. Med. 193:1303-1310; Taama, L. S. et al., 2001. Eur. J. Immunol. 31:1122-1131; Stephens, L. A. et al., 2001. Eur. J. Immunol. 31:1247-1245; Baecher-Allan, C. et al., 2001. J. Immunol. 167:1245-1253.)。これらの報告はマウスで知られているCD4及びCD25の発現を指標にヒト末梢血から分離された細胞集団を用いて種々の細胞表面マーカー、細胞の活性化刺激に対する不応性(anergy)、産生されるサイトカインの種類、in vitroにおける通常T細胞の増殖抑制機能及びその機構などの点においてマウスでの報告と同等であることを根拠としている。即ち、ヒト末梢血から分離されたCD4陽性CD25陽性T細胞は、CD45RC陽性のメモリーT細胞マーカーを発現しており、CD4陽性CD25陰性T細胞と比較してHLA-DRなどの活性化マーカーの発現が高い。また細胞内には定常的にCTLA-4を発現しており、刺激によりその発現が上昇する。更に抗CD3抗体刺激、抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激、同種異系の成熟樹状細胞(allogeneic mature DC)による刺激などでは、CD4陽性CD25陽性調節性T細胞

細胞のDNA合成及びサイトカインの産生は見られず、抗原刺激に対する不応状態(anergy)となっている。抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激にIL-2、IL-4、IL-15などのサイトカインを加えることで、CD4陽性CD25陽性調節性T細胞のDNA合成能は高まるが、CD4陽性CD25陰性T細胞のそれには及ばない。CD4陽性CD25陽性調節性T細胞存在下にCD4陽性CD25陰性T細胞を抗CD3抗体又は同種異系の成熟樹状細胞(allogeneic mature DC)によって刺激した場合、CD4陽性CD25陽性調節性T細胞非存在下と比較してCD4陽性CD25陽性調節性T細胞細胞数依存的な増殖抑制作用が見られる。マウスに比較して低いものの、CD4陽性CD25陽性調節性T細胞はIL-10、TGF- $\beta$ 1のような抑制性のサイトカインを産生する能力があるが、CD4陽性CD25陰性T細胞に対する増殖抑制作用は、これらサイトカインに対する中和抗体では解除されないこと、抑制作用にはCD4陽性CD25陰性T細胞とCD4陽性CD25陽性調節性T細胞の直接的細胞間接触が必要であることが報告されている。マウス、ラット、ヒトにおいてCD4陽性CD25陽性調節性T細胞の存在が報告され性状解析が進んではいるものの、これら細胞の詳細な分化機構、抑制作用機構の解明は途上にあり、特異的なマーカーも見出されていないのが現状である。

【0005】またマウス及びヒトにおいて、IL-10存在下での同種異系の(allogeneic)抗原刺激と同種異系の未成熟樹状細胞(allogeneic immature DC)による繰り返し刺激によって誘導される調節性T細胞についても報告されている(Groux, H. et al., 1997. Nature. 389:737-742; Jonuliet, H. et al., 2000. J. Exp. Med. 192:1213-1222.)。これらの細胞は、Th1, Th2細胞とは異なり大量のIL-10を産生するものの、TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-5の産生は高くなく、低レベルのIL-2を産生し、IL-4を産生しないことを特徴としており、Tr1細胞と呼ばれている。Tr1細胞もCD4陽性CD25陽性調節性T細胞と同様にanergicであるが、T細胞抑制機構は産生されるIL-10やTGF- $\beta$ 1によって一部説明可能である。しかしながら、Tr1細胞とCD4陽性CD25陽性調節性T細胞が全く異なるT細胞サブセットであるのか、或いは分化活性化段階の異なる同一の細胞であるかについては不明な点が多い。

【0006】マウスやラットで知られている調節性T細胞マーカーであるCD4、CD25の発現を指標として、ヒトにおいても末梢血などからCD4陽性、CD25陽性のT細胞を分離して見たところ、マウスやラットで知られているその他の細胞表面マーカーや機能と照らし合わせて同様であることが確認された。このことから、ヒトにおけるCD4陽性、CD25陽性の調節性T細胞の存在が示唆された。

【0007】これら細胞は、末梢血CD4陽性T細胞の5~10%を占めるに過ぎない希少細胞集団である上に、活性化・増殖刺激に対して不応状態である。この場合、抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激にIL-2、IL-4、IL-15な

どのサイトカインを加えることで細胞増殖を促す事は可能である。しかしながら、細胞数を増幅させヒトに移入するなどの臨床応用には十分なレベルではない。

【0008】調節性T細胞は、動物実験ではそれら細胞を移入することによって自己免疫疾患に抑制的に働くこと、移植拒絶反応や移植片対宿主病（GVHD）に抑制的に働くこと（Hara, M. et al., 2001. J. Immunol. 166:3789-3796; Taylor, P. A. et al., 2001. J. Exp. Med. 193:1311-1317.）から、調節性T細胞の免疫抑制作用を利用した細胞医療による自己免疫疾患、移植などにおける治療への応用が考えられる。調節性T細胞の増殖を促進する医薬組成物、あるいは患者又はボランティアから採取した末梢血、骨髓細胞を生体外で処理することにより、調節性T細胞を増殖させ、患者の体内に戻す療法の開発が期待されている。

#### 【0009】2. 4C8抗原

4C8抗原は元々ヒトT細胞が血管内皮細胞に接着した後、の内皮下への遊走に関与する分子を同定する目的で発見された、免疫系細胞の一部に発現する膜蛋白質である。ヒトT細胞をマウスに免疫することによって得られたモノクローナル抗体を、T細胞のインビトロ血管外遊走を抑制することを指標にスクリーニングすることにより、4C8抗原を認識するモノクローナル抗体が取得された（Masuyama, J. et al., 1999. J. Exp. Med. 189:979-989; WO99/12972号公報）。T細胞が炎症局所などの末梢組織に移行するためには、血管内皮細胞にインテグリン分子を介して強固に接着した後に細胞運動に適した形態に変化し、血管内皮細胞間隙をすり抜けて遊走する過程が必要である。血管内皮細胞に接着したT細胞全てが内皮下へ遊走するのではなく、CD4陽性CD45RO陽性CD26陽性の活性化メモリーT細胞が選択的に遊走することが知られている。即ち抗4C8モノクローナル抗体（mAb）はT細胞の血管内皮細胞への接着は抑制せずに、T細胞サブセット選択的な内皮下への遊走を特異的に抑制するmAbであり、4C8抗原はこのような遊走に必須の機能分子であると考えられる。抗4C8 mAbにより4C8抗原の発現を検証したところ、4C8抗原はCD3陽性T細胞に強く発現する他、B細胞、NK細胞、単球、好酸球にも発現するが、好中球や内皮細胞には発現しない。抗4C8 mAbによる架橋はT細胞のアクチン重合を促進し細胞形態に極性をもたせるのみならず、細胞運動を刺激する。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、調節性T細胞の分化誘導・増殖促進方法を提供することを目的とする。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、4C8抗原と抗4C8 mAbの相互作用の解明を進める過程において、上述したT細胞の遊走阻害という既存の知見からは予想できない新

規な機能、すなわちCD3アゴニストによる刺激下において、抗4C8 mAbが4C8抗原を発現する免疫細胞に作用することにより副刺激(costimulation)をもたらす、調節性T細胞の分化誘導と増殖が促進されることを発見し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0012】1. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞に、CD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストを作用させることを特徴とする、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進する方法。

2. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血、リンパ節又は胸腺に含まれるものである1の方法。

3. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、T細胞である1の方法。

【0013】4. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血単核球である1の方法。

5. CD3アゴニストが、抗CD3抗体である1の方法。

6. 4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である1の方法。

7. 抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である6の方法。

【0014】8. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が、生体内で行われるものである1の方法。

9. CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が、生体外で行われるものである1の方法。

10. 分化誘導された調節性T細胞が、CD25及びCD152を発現し、かつ、IL-10を産生するものである1の方法。

【0015】11. 分化誘導された調節性T細胞が他のT細胞のサイトカイン産生、増殖及び／又は活性化を抑制するものである1の方法。

12. 4C8抗原アゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進するための医薬組成物。

13. 4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である12の医薬組成物。

14. 抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である13の医薬組成物。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本明細書において、4C8抗原アゴニストとは、免疫細胞表面に発現した4C8抗原に作用することにより、4C8抗原を介した細胞内への副刺激信号伝達により、①当該細胞が調節性T細胞へ分化し、②当該細胞が調節性T細胞としての特性を保持した状態で増殖するという2つの反応のいずれか一方又は双方を惹起する物質を意味する。4C8抗原アゴニストは4C8抗原に対する天然のリガンド、および4C8抗原に対する抗体を包含する。抗体の具体的例は独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託セン

ター（茨城県つくば市1丁目1番地1）に平成13年（2001年）9月26日付けにて寄託されたハイブリドーマJM-1（寄託番号FERM BP-7757）の産生する抗4C8抗体である。本発明において使用される抗体は、上述の抗4C8抗体に限定されるものではない。益山らの報告（Masuyama, J. et al., 1999, J. Exp. Med. 189:979-989; WO 99/12972号公報）に従い、ヒトT細胞を免疫した動物より得られたモノクローナル抗体から、T細胞のインビトロ血管外遊走を抑制することを指標に選抜することにより、4C8抗原アゴニスト機能を有する抗体を取得することができる。

【0017】抗原として使用されるT細胞は、ヒトから採取された末梢血単核球画分を、コラーゲンゲル上で単層に培養されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）と共培養した後、該単層を通過して遊走した単核球を用いることにより、効率的に所望の抗体を取得しうる。ハイブリドーマの選抜にあたっては、ハイブリドーマJM-1により産生される抗4C8抗体を競合試薬として用いることにより、被検抗体によるT細胞染色が抑制されること（すなわちハイブリドーマJM-1により産生される抗4C8抗体と同一エピトープを認識すること）を指標にした選抜を組み合わせてすることにより、取得はさらに容易となる。また、抗4C8抗体と同一エピトープを認識する抗体の選抜工程と、本発明の実施例に記載した調節性T細胞の分化・増殖誘導能を評価する工程を組み合わせてすることによっても、本発明に使用する抗体を容易に取得することができる。また、例えばハイブリドーマJM-1により産生される抗4C8抗体の変換領域をヒト抗体のフレームワークに移植することにより、本発明に使用する抗体としていわゆるヒト化抗体を取得することも可能である。また、再配列されていないヒト抗体遺伝子を保持し、抗原の感作により当該抗原に特異的なヒト抗体を産生するマウス（例えばTomizuka et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722）を使用することにより、本発明に使用する抗体としてヒト抗体を取得することも可能である。

【0018】本発明の方法において、4C8抗原を発現する免疫細胞に対して、4C8抗原アゴニストを作用させることに加えて、CD3アゴニストを作用させることが必要である。T細胞の分化に関わる主たる刺激伝達経路であるCD3分子を介した信号伝達系を主刺激経路とすれば、4C8抗原を介した経路がいわゆる副刺激経路となる。本明細書において、CD3分子を介した刺激に加えて4C8抗原を介した刺激をもたらすことを、4C8副刺激と称することがある。本明細書においてCD3アゴニストとは、免疫細胞の表面に発現したCD3分子に作用し、CD3を介した細胞内への信号伝達により、当該細胞の分化が促進されるという反応を惹起しうる物質を意味する。CD3アゴニストの例としてアゴニスティックな抗CD3抗体、例えばOKT3（ATCC CRL-8001）、UCHL1（B.D. PharMingen）、HIT3a

（B.D. PharMingen）が挙げられる。また、種々のT細胞抗原受容体に対するアゴニスト、特にアゴニスト作用を有する抗体も、T細胞抗原受容体とCD3の複合体形成をもたらす、CD3を介した細胞内への信号伝達をもたらすので、本発明におけるCD3アゴニストとして使用することができる。具体的には、ヒトT細胞抗原受容体V beta6.7に対する抗体であるOT145（Posnett et al., 1986, Proc Natl Acad Sci U S A., 83(20):7888-92）などが挙げられる。

【0019】本発明によって、4C8抗原アゴニストを有効成分とする、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進するための医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、生体内に投与されるものであってもよいし、患者又はボランティアから採取した免疫細胞、あるいは免疫細胞を含む末梢血、リンパ液、リンパ節細胞、胸腺細胞を生体外で処理するためのものであってもよい。本発明の医薬組成物は、周知慣用の方法で製剤化されうる。すなわち治療効果上許容される種々の添加物、例えば担体、pH緩衝剤、安定化剤、附形剤等を添加した医薬製剤が製造される。このような製剤は、好ましくは、生理学的に許容され得る希釈剤又はキャリアを含んでおり、適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、4C8抗原アゴニストは凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記の緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。上記製剤の投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

【0020】投与方法、投与量は前臨床試験、臨床試験の過程において適宜決定されうる。例えば、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.01 mg～1000 mgであり、これらを1回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約0.01 mg～1000 mgを皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。

【0021】治療の対象となる疾患は、免疫抑制効果をもたらす処置が必要とされる疾患であり、具体的には移植片対宿主病（GVHD）の治療又は予防を目的とした臓器移植前後における処置、リウマチなどの自己免疫疾患の治療又は予防が挙げられる。

【0022】本発明において、患者又はボランティアから採取した免疫細胞、あるいは免疫細胞を含む末梢血、リンパ液、リンパ節細胞、胸腺細胞を生体外で処理することにより、調節性T細胞を増殖させ、患者の体内に戻す療法を採用することができる。末梢血又は骨髓細胞を生体より採取し、患者の体内に戻す幹細胞移植療法はす

で実施されている。また、免疫細胞の一種である樹状細胞 (dendritic cell) に人為的処理を施し、患者の体内に戻す癌治療も行われている (M. Jefford, et al., The Lancet Oncology, 2: 343-353, June, 2001)。採取された免疫細胞に、4C8抗原アゴニスト及びCD3アゴニストを添加し、調節性T細胞を増殖させた後に患者の体内に戻すことにより治療又は予防効果を奏することができる。このようないわゆるエキスポ (ex vivo) の方法は、基礎研究の場において開発された実験系をほぼそのまま治療の場において再現するものであるとも言える。薬剤の生体内への投与が、体内吸収、代謝、又は未知の因子による干渉作用などの影響により、期待した治療効果を奏しえない場合がありうるものと比較すると、より実用化へのリスクの低い方法であるといえる。

【0023】

【実施例】以下に本発明の具体的態様と効果を例示した実施例を記載する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【0024】(実施例1：抗4C8 mAbのT細胞活性化に対する副刺激能) 抗4C8 mAbのT細胞活性化における副刺激能を見るために、至適濃度以下の抗CD3抗体存在下で固相化抗4C8 mAbで刺激した場合のヒト末梢血由来ナイーブ (naive) T細胞 (CD3陽性CD45RA陽性細胞) とメモリー (memory) T細胞 (CD3陽性、CD45RO陽性細胞) の増殖能 (DNA合成能)、IL-2産生能、T細胞活性化マーカー (CD25) の発現、生細胞数増加を指標に抗4C8 mAbの影響を調べた。比較対照としてはT細胞活性化における副刺激受容体として広く認知されているCD28からの刺激 (抗CD28抗体) を加えた群と比較した。

【0025】ヘパリン加ヒト末梢血からFicoll-Hypaqueによる密度勾配遠心法により末梢血単核球を分離した。CD4陽性T細胞を用いる場合は以下のように調製した。ナイロンウールカラム非吸着画分としてT細胞濃縮画分を調製した。本画分はフローサイトメーター (FACSscan, Becton-Dickinson, Mountain View, CA) 解析により90%以上のCD3陽性細胞を含んでいた。フローサイトメーター解析では  $5 \times 10^5$  イベントを集め、細胞クエストソフトウェア (Becton-Dickinson) を用いて実施した。本画分より、試薬製造者の操作手順書 (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada) に従いCD4陽性T細胞をネガティブセレクション (negative selection) によって調製した。ヒト末梢血由来T細胞サブセットを用いる場合は以下の方法により調製した。CD3陽性CD45RA陽性細胞とCD3陽性、CD45RO陽性細胞は、それぞれ末梢血単核球から細胞ect<sup>+</sup> plus Human CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> / CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> kit (Cytovax Biotechnologies Inc., Edmonton, Canada) によって調製した。各細胞画分の純度はフローサイトメーター (FACSscan, Becton-Dickinson, Mountain View, CA) 解析により91%~96%であった。

【0026】各T細胞サブセットに対する抗4C8 mAbの

副刺激能は以下の方法により測定した。96-well平底マイクロタイタープレート (Falcon, Becton-Dickinson) に抗CD3mAb (OKT3, Dr. S. Kashiwagi, Japan Immunoresearch Laboratories Co., Ltd, Gunma, Japanより供与)  $0.1 \mu\text{g/ml}$  濃度含有PBS ( $100 \mu\text{l}$ ) を添加して4°Cで24時間インキュベーションし固相化後、精製抗4C8 mAb ( $10 \mu\text{g/ml}$ :  $100 \mu\text{l}$ ) を同様に固相化した。PBSで2回洗浄後、1% BSA/PBS ( $100 \mu\text{l}$ ) を添加して37°C 1時間インキュベーションして、アッセイに供した。抗CD28 mAb (clone CD28.2, PharMingen, San Diego, CA) は最終濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  でアッセイ培養開始時に添加した。細胞は、RPMI 1640 (Sigma) / 10% FCS / ペニシリン ( $100 \text{ U/ml}$ ) / ストレプトマイシン ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) / 2 mM グルタミン培地に懸濁して、 $2 \times 10^5$  細胞/well/ $200 \mu\text{l}$  となるよう添加してアッセイした。37°C、5%  $\text{CO}_2$  存在下で3日間培養し、細胞回収前8~16時間に  $0.2 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -thymidine (New England Nuclear, Boston, MA) を添加して培養を継続した。細胞をガラスフィルター上に回収し、液体シンチレーションカウンターにて細胞に取り込まれた  $^3\text{H}$ -thymidine を測定した。一群3wellでアッセイし平均値とSD値を算出した。

【0027】その結果を図1Aに示す。抗CD3 mAb単独と比較して、抗4C8 mAb共存下ではT細胞への  $^3\text{H}$ -thymidine 取込み能は強力に増強された。抗4C8 mAb単独では全く影響を与えないことから、抗4C8 mAbはT細胞増殖において副刺激として作用することが示された。対照群である抗CD3 mAbと抗CD28 mAb添加群でも強い  $^3\text{H}$ -thymidine 取込みが見られたが、本実験条件下では抗4C8 mAbの方が抗CD28 mAbと比較してより強い副刺激能を有していた。またナイーブT細胞 (CD3陽性CD45RA陽性細胞) とメモリーT細胞 (CD3陽性、CD45RO陽性細胞) 両方に対して抗4C8 mAbが作用すること、メモリーT細胞の方がナイーブT細胞に比較して抗4C8 mAb及び抗CD28 mAb何れに対しても増殖能が高いことが示された。

【0028】CD28以外のT細胞に定常的に発現している分子、例えばCD2、CD9、CD11aなどを介した副刺激でも、CD28からの刺激と同等にT細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取込みが増強されるが、CD28からの刺激とは異なりIL-2産生誘導能が低いためにT細胞増殖を維持することが出来ず、活性化されたT細胞はアポトーシスをおこすことが知られている。そこでCD3<sup>+</sup>T細胞を用いて  $^3\text{H}$ -thymidine 取込み実験と同様の条件下で刺激24時間後の培養上清中のIL-2濃度をELISA kit (Biosource) により測定した (図1B)。大量のIL-2産生が4C8副刺激、CD28副刺激の両方において誘導されたが、前者は後者と比較して約50%以上高いIL-2産生を誘導した。但し、両者において培養上清中のIL-2は培養時間と共に急速に減少し、培養3日目では検出限界以下までに減少した。IL-2受容体であるCD25が高発現していることが、副刺激を受けたT細胞が継続的な増殖を続けるために必要であることから、

4C8副刺激、CD28副刺激を受けた培養24時間後のT細胞でのCD25の発現を比較した。CD25の発現は、 $2-3 \times 10^5$  細胞をFITC標識抗CD25 mAb (クローンM-A261, PharMingen, San Diego, CA)と共に20分間0.05 % アジ化ナトリウム存在下水中でインキュベートして1 mlのPBS / 0.1 % BSA / 0.05 % アジ化ナトリウムにて2回洗浄後、0.5 ml PBS / 1 % パラホルムアルデヒドで固定した後FACSscan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) にて解析した。図1Cに示すように、4C8副刺激はCD28副刺激と比較して、CD25発現T細胞の割合が顕著に高い(4C8: 98 %, CD28: 25%)。

【0029】4C8副刺激では、培養後24時間で75 %の細胞がCD25を発現するという急速な発現細胞増加誘導であるのに対して、CD28副刺激では培養時間に伴い徐々にCD25陽性細胞が出現するに過ぎない。

【0030】更に培養後2~5日後の生細胞数を、培養前の細胞数を100 %として、4C8副刺激とCD28副刺激で比較した(図1D)。生細胞数は、上記刺激条件下に培養後、96wellマイクロタイタープレートの同一群の3 wellから回収した細胞をトリパンブルー色素排除法(trypsin blue dye exclusion法)にてカウントした。CD28副刺激では、培養3日後から徐々に細胞数が増加して培養後5日目で細胞数が2倍となる。4C8副刺激でもほぼ同様の細胞数増加が見られたが、培養2日目で一過的に僅かな細胞数の減少の後急速に細胞数が増加してCD28副刺激よりも多い細胞数増加を誘導した。一方、抗CD3 mAb単独及び抗4C8 mAb単独の刺激では細胞数の増加はなく培養5日目では減少する。

【0031】抗アポトーシス遺伝子産物であるBcl- $\chi_L$ の誘導はCD28副刺激においてT細胞抗原受容体からの刺激によるアポトーシスを抑制しT細胞細胞数の増加において重要な役割を担っている。事実、CD28以外の副刺激ではT細胞細胞数の増加が誘導されないが、IL-2産生と同様Bcl- $\chi_L$ の誘導が起こらない。そこで、細胞数増加を誘導する4C8副刺激においてBcl- $\chi_L$ が誘導されるかどうかをウエスタンブロットにより確認した。上記の方法で活性化したT細胞を、刺激して24時間後に $5 \times 10^5$ 個の生細胞を回収しPBSで洗浄後、細胞溶解緩衝液(1 % Nonidet P-40, 0.1 % SDS, 1 % デオキシコール酸ナトリウム, 30  $\mu$ g/ml アブロチニン, 50  $\mu$ g/ml ロイベプチン, 100  $\mu$ g/ml PMSF, 1 mM オルトバナジル酸ナトリウム(sodium orthovanadate)にて溶解後、SDSサンプル緩衝液で煮沸し、12 % SDS-PAGEに供し、ゲルからニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は5 % スキムミルク含有Tris緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20)でブロッキング後に1 % スキムミルク含有Tris緩衝液中にて抗Bcl- $\chi_L$ ポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)と反応させた。ニトロセルロース膜を洗浄後西洋ワサビペルオキシダーゼ標識2次抗体(1/10,000希釈)と反応させECL chemilumine

science試薬(Amersham)にて現像した。培養3日目にCD28副刺激と同様4C8副刺激でもBcl- $\chi_L$ 発現が確認された。

【0032】以上の結果により、4C8抗原からの抗4C8 mAbによる刺激はCD3からの同時刺激によってT細胞にIL-2産生誘導、CD25発現誘導、Bcl- $\chi_L$ 発現誘導を伴うT細胞細胞数増加を誘導することが示された。4C8抗原は最大限のT細胞活性化を誘導する副刺激分子である。

【0033】(実施例2: 4C8副刺激により誘導されたCD4陽性T細胞からのサイトカイン産生パターン) ナイブT細胞は特定の条件で活性化された(一次刺激)後に、再び刺激を受けた(二次刺激)際にTh1細胞やTh2細胞と呼ばれるサイトカイン産生パターンの偏りを持つ分化したT細胞が誘導されることが知られている(Th細胞の分極化(polarization))。4C8副刺激がこのようなT細胞polarizationを誘導するかどうかを、IL-2, IL-10の産生を指標に検討した。T細胞調製方法及び一次刺激における4C8副刺激、CD28副刺激を含むT細胞刺激は実施例1の方法と同様である。一次刺激培養3日後に細胞を回収し洗浄後、無刺激下に4~6日間培養して休止状態にした後に、図2に示す方法で二次刺激を行った。即ち、二次刺激は、0.1  $\mu$ g/ml抗CD3 mAbを平底96穴プレートに固相化し、これに $1 \times 10^5$ 個の細胞をいれ、抗CD28 mAb 5  $\mu$ g/mlを添加、未添加で培養した。IL-2は24時間後、IL-10は48時間後の培養液を取り、ELISA kit (Biosource)にて測定した。二次刺激時の対照群として、新たに調製した無刺激のT細胞を用いた。図2Aに示すように、4C8副刺激後のT細胞は抗CD3 mAbと抗CD28 mAbの二次刺激によって大量のIL-10を産生する。一方、新たに調製したT細胞及びCD28副刺激後のT細胞は抗CD3 mAbと抗CD28 mAb刺激では夫々少量及び極微量のIL-10しか産生しなかった。一方、IL-2産生は、4C8副刺激後のT細胞では抗CD3 mAbと抗CD28 mAbの二次刺激では検出限界以下であったのに対して、新たに調製したT細胞及びCD28副刺激後のT細胞では後者は前者に比較して低いレベルであったが有意な産生が見られた(図2B)。抗CD3 mAb単独での刺激では何れの群においてもサイトカイン産生は誘導されなかった。サイトカイン産生パターンにおいて4C8副刺激とCD28副刺激で誘導されるT細胞には明らかな差異がみられた。4C8副刺激によって誘導されるT細胞は、主にIL-10を大量に産生し、IL-2を産生しない点において調節性T細胞と同様であることが示唆された。

【0034】(実施例3: 4C8副刺激によって誘導されたCD4陽性T細胞は抗CD3刺激に低応答性である) 調節性T細胞は、ポリクローナルな或いは抗原特異的な刺激に対して低応答性又は不応答性(anergy)であることが知られている。そこで、4C8副刺激で誘導されたT細胞の抗CD3 mAb刺激に対する増殖能を見た。実施例1と同様の方法で刺激した4C8副刺激及びCD28副刺激して誘導さ



れた培養3日目の細胞を回収し洗浄後、無刺激下に4~6日間培養して休止状態にした後に、 $1 \times 10^5$  細胞/well、 $200 \mu\text{l}$ /wellでU底96 wellマイクロタイタープレートにまき、放射線照射(6,000 rads)末梢血単核球( $4 \times 10^5$  細胞/well)存在下に可溶性抗CD3 mAb (10 ng/ml)を添加し、抗CD28 mAb (5  $\mu\text{g}$ /ml)又はIL-2 (100 U/ml)の存在下又は非存在下で3日間培養して、 $^3\text{H}$ -thymidineの取込みを、実施例1と同様の方法にて測定した。この時、実施例2と同様に新たに調製したT細胞を用いた。

【0035】図3に示すように、新たに調製したT細胞及びCD28副刺激して誘導されたT細胞は、抗CD3 mAb刺激により強い増殖反応が見られ、これはIL-2又は抗CD28 mAbによる刺激を加えることで更に増強された。一方、4C8副刺激で誘導されたT細胞は、抗CD3 mAb刺激により僅かな増殖反応しか示さなかったが、IL-2又は抗CD28 mAbによる刺激を加えることで増殖反応は強く増強された。特にIL-2を添加した場合は、新たに調製したT細胞及びCD28副刺激して誘導されたT細胞に比べて常に高い反応性を示した。これらのことより、4C8副刺激で誘導されたT細胞は調節性T細胞と同様に抗CD3 mAbによる刺激には低応答性であるが、IL-2又はCD28副刺激により低応答性が解除されることが示された。

【0036】(実施例4: 4C8副刺激で誘導されたCD4陽性T細胞は、他のT細胞のポリクローナルな刺激での活性化を抑制する) 調節性T細胞は、他のT細胞の増殖反応を抑制することが知られていることから、4C8副刺激で誘導されたT細胞の抑制能を検討した。実施例3と同様に調製した放射線照射(6000 rads)済みの4C8副刺激後のT細胞、CD28副刺激後のT細胞及び新たに調製したT細胞(対照群)を、新たに調製したCD4陽性T細胞( $1 \times 10^5$  細胞/well)と1:1の細胞数比で混合し、放射線照射(6,000 rads)末梢血単核球( $4 \times 10^5$  細胞/well)存在下に可溶性抗CD3 mAb (10 ng/ml)を添加し、3日間培養して、 $^3\text{H}$ -thymidineの取込みを測定した。ここで用いた細胞の組み合わせは同一提供者由来である。図4Aに示すように、4C8副刺激後の細胞と共培養した群は、新たに調製したT細胞と共培養した対照群と比較して、約80%の増殖抑制が見られたのに対して、CD28副刺激後の細胞と共培養した群では約25%の抑制しか見られなかった。このアッセイ系にIL-2 (100 U/ml)を添加した場合には、4C8副刺激後の細胞と共培養した群ではIL-2非存在下の場合と比較して増殖反応は約2倍になったが、対照群と比較して抑制効果は解除されなかった。調節性T細胞の抑制作用は、他のT細胞からのIL-2産生を抑制することによると報告されていることから、上記と同様の系において、添加する細胞の比を図4Bに示すように変えて、共培養後24時間後の培養上清中のIL-2をELISAにて測定した。

【0037】CD28副刺激後のT細胞(○)は添加細胞数が多くなると新たに調製したT細胞を添加した対照群

(●)に比較して僅かにIL-2産生を増加させる傾向がみられたが、何れの細胞比においても対照群との差は見られなかった。しかしながら、4C8副刺激後のT細胞

(□)は、添加細胞数に依存的にIL-2産生を阻害し、反応細胞数の2倍を添加した場合はIL-2産生は検出限界以下となった。これらの結果は、4C8副刺激は、CD28副刺激とは異なり、他のT細胞の増殖反応をIL-2産生を阻害することで抑制する機能を有する調節性CD4陽性T細胞を誘導することを示す。

【0038】(実施例5: 4C8副刺激で誘導されるCD4陽性T細胞は、細胞表面のCD25及び細胞内のCD152の高発現を維持する) CD4陽性調節性T細胞は、細胞表面でCD25及び細胞内でCD152 (CTLA-4)を高発現することから、4C8副刺激及びCD28副刺激3日目の細胞と、その後細胞を回収し洗浄後、無刺激下に更に3日間又は6日間培養したときの、細胞表面でCD25及びCD152 (PE標識抗CD152 mAb (Sigma Chemical Co.))を発現する細胞の割合をFACScanにて解析した(実施例1と同様の方法)。

【0039】4C8副刺激した細胞(□)は、刺激後の休止培養期間においてもCD28副刺激後の細胞(○)と比較して高い割合の細胞がCD25の発現を維持していた(図5A上パネル)。一方、細胞表面にCD152を発現する細胞の割合は、4C8副刺激3日目の細胞ではCD28副刺激細胞と比較して非常に高く、4C8副刺激及びCD28副刺激した細胞何れにおいても刺激後の休止培養3日目でバックグラウンドレベルに落ちた(図5A下パネル)。細胞内CD152の発現を、細胞表面での発現が見られない副刺激後の休止培養4日目の細胞で解析した。細胞内CD152の発現は、細胞をはじめにQuantum Red™標識抗CD4 mAb (Sigma Chemical Co.)で染色後に細胞をPermeaFix (Ortho Diagnostics, Raritan, NJ)で固定、透過処理後に、PE標識抗CD152 mAb (Sigma Chemical Co.)で染色した。4C8副刺激後の細胞では、大部分の細胞が細胞内にCD152を発現しているのに対して(図5B右パネル)、CD28副刺激後の細胞では僅かな細胞集団のみに発現が見られた(図5B左パネル)。

【0040】(適応症の例示) 4C8副刺激によってヒト末梢血T細胞から誘導されるT細胞は、CD25、CD152を高発現しIL-10を高産生し、他のT細胞の増殖応答を抑制する機能を有する細胞であり、これまで動物及びヒトで報告されてきた抑制性のCD4陽性調節性T細胞と同様の性状を有している。本発明において、4C8副刺激でこのようなT細胞は細胞数増加を伴い増殖することが明らかにされた。更に別の刺激やIL-2などのサイトカインなどとのコンビネーションにより、ex vivoにおいて大量の細胞を増幅することが可能であることが示唆される。調節性T細胞は、動物実験ではそれら細胞を移入することによって自己免疫疾患に抑制的に働くこと、移植拒絶反応やGVHDに抑制的に働くこと(Hara, M. et al., 2001. J. Immunol. 166:3789-3796.; Taylor, P. A. et al.

1., 2001. J. Exp. Med. 193:1311-1317) から、調節性T細胞の免疫抑制作用を利用した細胞医療によるリウマチなどの自己免疫疾患、移植などにおける治療への応用が考えられる。

【0041】

【発明の効果】本発明により、調節性T細胞の分化誘導・増殖促進方法、及び該方法に使用する医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、調節性T細胞の免疫抑制作用を利用した細胞医療による自己免疫疾患、移植などにおける治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1A】各T細胞サブセットに対する抗4C8 mAbの副刺激能を測定した結果を示す図である。

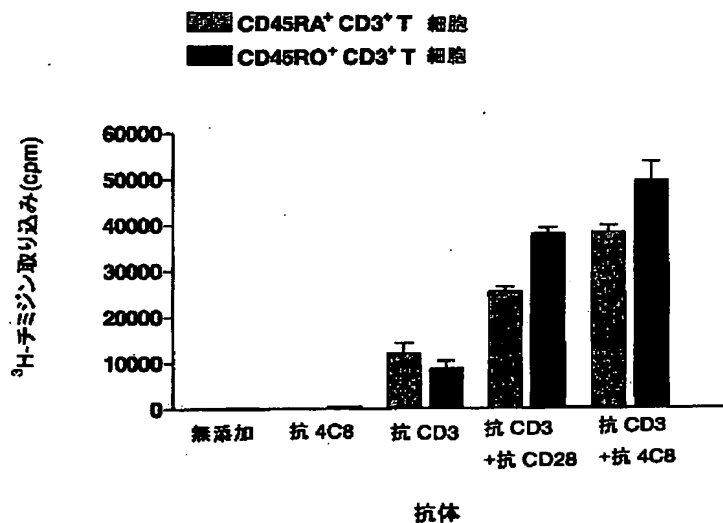
【図1B】CD3<sup>+</sup> T細胞を用いて刺激24時間後の培養上清中のIL-2濃度をELISAにより測定した結果を示す図である。

【図1C】4C8副刺激、CD28副刺激を受けた培養3日目のT細胞におけるCD25の発現を比較した結果を示す図である。4C8副刺激後のCD25陽性細胞は太実線、CD28副刺激後のCD25陽性細胞は細実線で示されている。破線は、陰性対照群（抗CD25抗体のアイソタイプ一致抗体コントロール）である。

【図1D】培養後2～5日後の生細胞数を、培養前の細胞数を100%として、4C8副刺激とCD28副刺激で比較したときの結果を示す図である。

【図2A】4C8副刺激がT細胞polarizationを誘導する\*

【図1A】



\*かどうかを、IL-10の産生を指標に検討した結果を示す図である。

【図2B】4C8副刺激がT細胞polarizationを誘導するかどうかを、IL-2の産生を指標に検討した結果を示す図である。

【図3】4C8副刺激で誘導されたT細胞の抗CD3 mAb刺激に対する増殖能を調べた結果を示す図である。

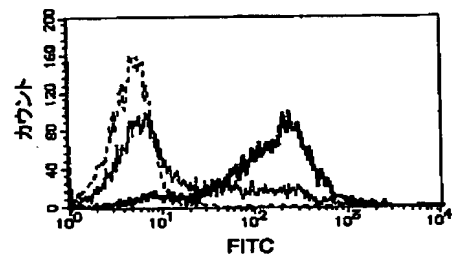
【図4A】4C8副刺激で誘導されたT細胞の他のT細胞に対する増殖抑制効果を検討した結果を示す図である。

10 【図4B】4C8副刺激後の細胞と新たに調製したT細胞とを抗CD3抗体刺激下で共培養した後24時間後の培養上清中のIL-2をELISAにて測定した結果を示す図である。●は新たに調製したT細胞と共培養した時のIL-2産生を、○はCD28副刺激後のT細胞と共培養した時のIL-2産生を、□は4C8副刺激後のT細胞と共培養した時のIL-2産生を表わす。

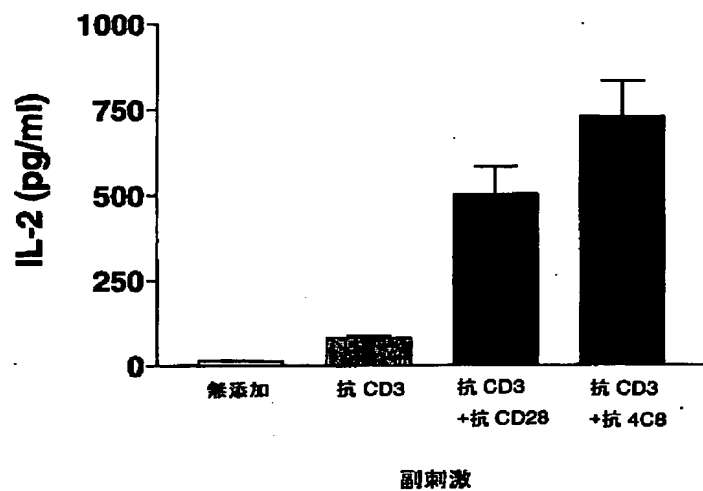
20 【図5A】4C8副刺激及びCD28副刺激3日目の細胞と、その後細胞を回収し洗浄後、無刺激下に更に3日間又は6日間培養したときの、細胞表面でCD25及びCD152を発現する細胞の割合をFACScanにて解析した結果を示す図である。

【図5B】4C8副刺激及びCD28副刺激3日目の細胞と、その後細胞を回収し洗浄後、無刺激下に更に4日間培養したときの、細胞表面でCD4及び細胞内でCD152を発現する細胞の割合をFACScanにて解析した結果を示す図である。

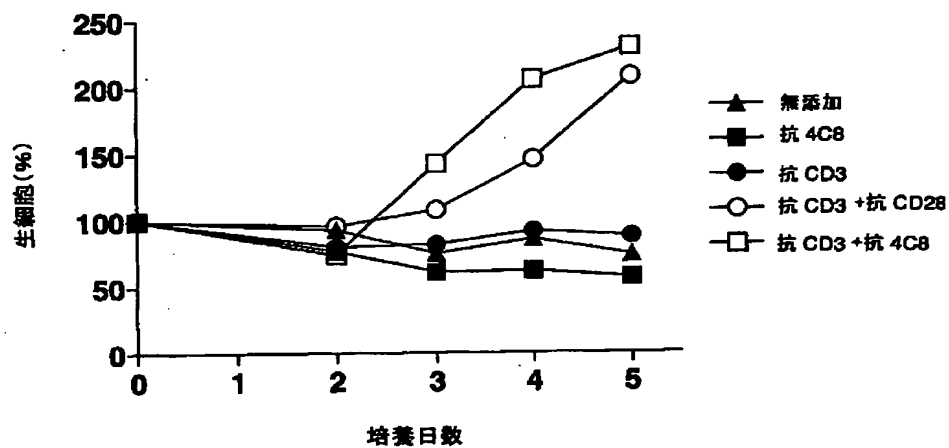
【図1C】



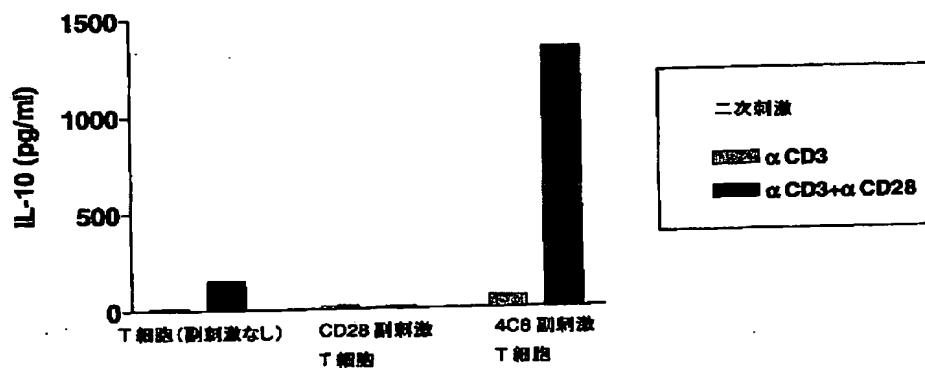
【図1B】



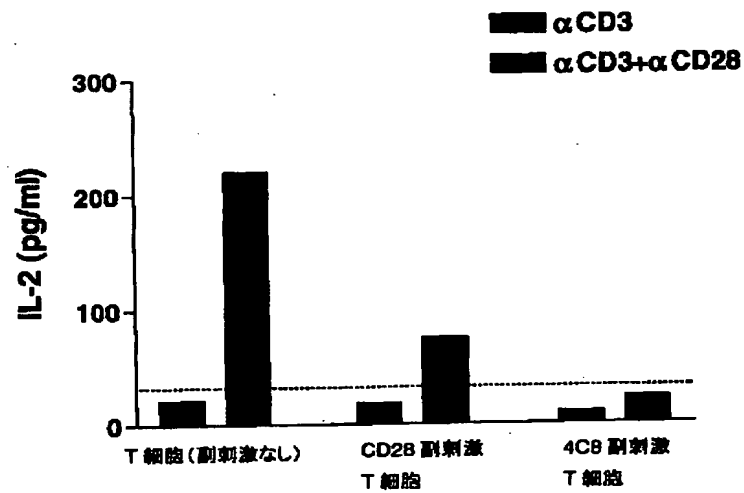
【図1D】



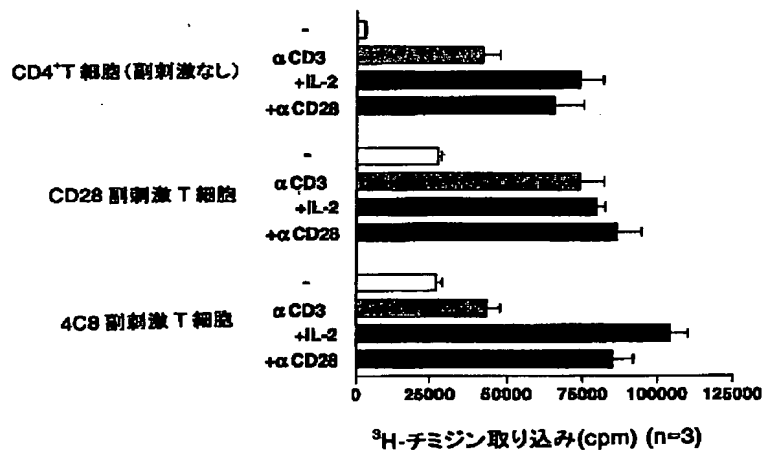
【図2A】



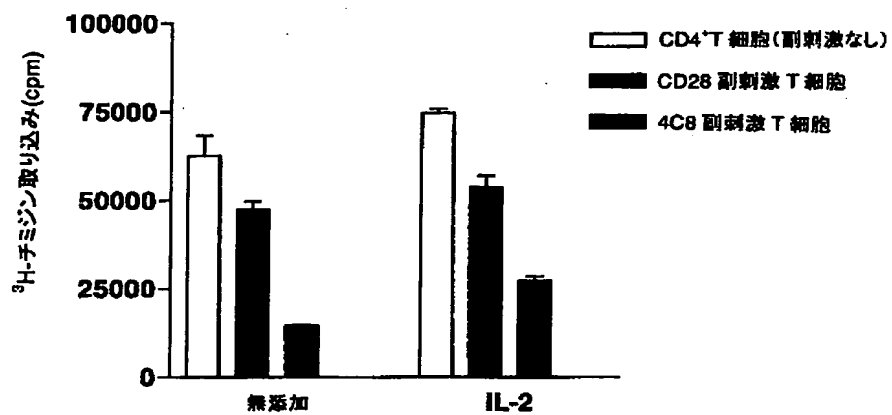
【図2B】



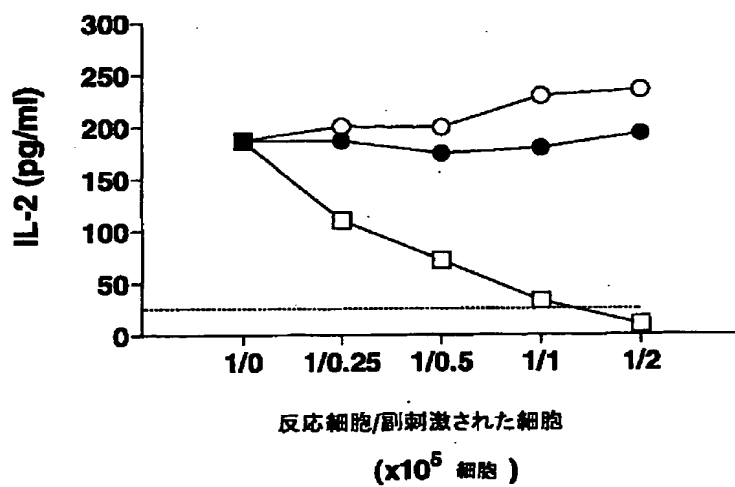
【図3】



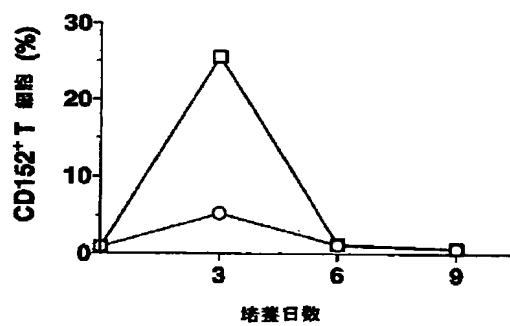
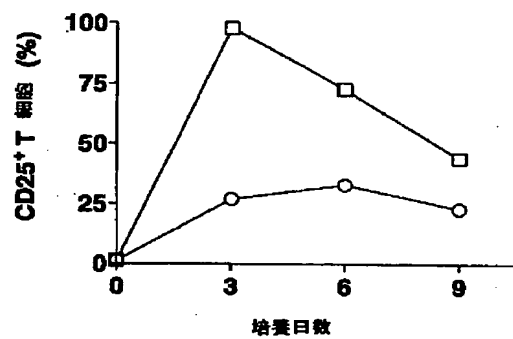
【図4A】



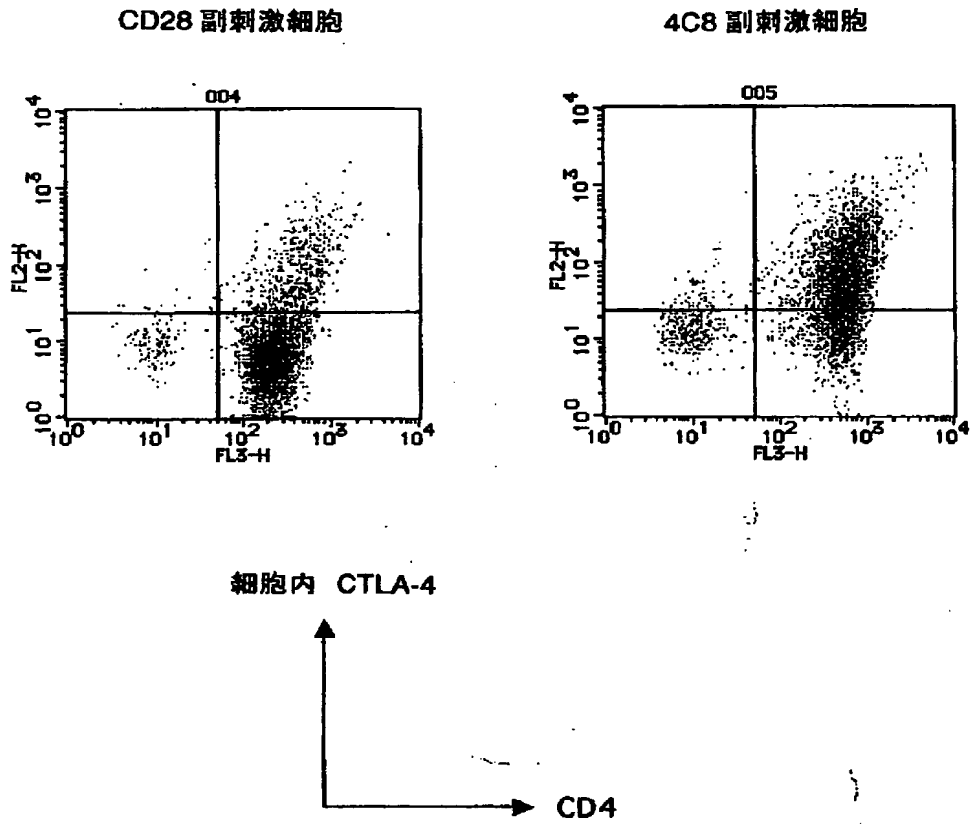
【図4B】



【図5A】



【図5B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A61P 37/06

識別記号

F I

C12N 5/00

テーマコード(参考)

ZNAE

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】 第1部門第1区分  
 【発行日】 平成17年6月16日(2005.6.16)

【公開番号】 特開2003-102471(P2003-102471A)  
 【公開日】 平成15年4月8日(2003.4.8)  
 【出願番号】 特願2001-305588(P2001-305588)  
 【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 37/06

【F I】

C 1 2 N 5/00 Z N A E  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 P 29/00 1 0 1  
 A 6 1 P 37/06

【手続補正書】

【提出日】 平成16年9月24日(2004.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞に、CD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストを作用させることを特徴とする、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進する方法。

【請求項2】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血、リンパ節又は胸腺に含まれるものである請求項1記載の方法。

【請求項3】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、T細胞である請求項1記載の方法。

【請求項4】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞が、末梢血単核球である請求項1記載の方法。

【請求項5】

CD3アゴニストが、抗CD3抗体である請求項1記載の方法。

【請求項6】

4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である請求項1記載の方法。

【請求項7】

抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である請求項6記載の方法。

【請求項8】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が、生体内で行われるものである請求項1記載の方法。

【請求項9】

CD3及び4C8抗原を発現する免疫細胞へのCD3アゴニスト及び4C8抗原アゴニストの作用が



、生体外で行われるものである請求項1記載の方法。

【請求項10】

分化誘導された調節性T細胞が、CD25及びCD152を発現し、かつIL-10を産生するものである請求項1記載の方法。

【請求項11】

分化誘導された調節性T細胞が、他のT細胞のサイトカイン産生、増殖及び／又は活性化を抑制するものである請求項1記載の方法。

【請求項12】

4C8抗原アゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進するための医薬組成物。

【請求項13】

4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である請求項12記載の医薬組成物。

【請求項14】

抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である請求項13記載の医薬組成物。

【請求項15】

請求項1～11のいずれか1項に記載の方法により得られた調節性T細胞。

【請求項16】

請求項15に記載の調節性T細胞を含む、免疫抑制のための医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

11．分化誘導された調節性T細胞が他のT細胞のサイトカイン産生、増殖及び／又は活性化を抑制するものである1の方法。

12．4C8抗原アゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導及び／又は増殖を促進するための医薬組成物。

13．4C8抗原アゴニストが、抗4C8抗体である12の医薬組成物。

14．抗4C8抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である13の医薬組成物。

15．1～11のいずれかの方法により得られた調節性T細胞。

16．15の調節性T細胞を含む、免疫抑制のための医薬組成物。